

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

05-16-00

Attorney's Docket No.: 06501-054001 / CI-901PCT-US

Gp 1643

#4



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Shigeaki Kato et al.

Art Unit : 1643

Serial No. : 09/489,198

Examiner : Unknown

Filed : January 20, 2000

Title : GENE SCREENING METHOD USING NUCLEAR RECEPTOR

RECEIVED

MAY 18 2000

Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

TECH CENTER 1600/2900

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC §119 from Japanese Application No. PCT/JP98/03280 filed July 22, 1998 which claims priority from Japanese Patent Application No. 9/212624. A certified copy of the application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: 5-12-00

John T. Li
John T. Li
Reg. No. 44,210

Fish & Richardson P.C.
225 Franklin Street
Boston, MA 02110-2804
Telephone: (617) 542-5070
Facsimile: (617) 542-8906

20055841.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner of Patents, Washington, D.C. 20231.

Date of Deposit

Signature

Typed or Printed Name of Person Signing Certificate

May 12, 2000

Jeanine Mecherka

Jeanine Mecherka



日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 7 年 7 月 2 2 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 9 年特許願第 2 1 2 6 2 4 号

出 願 人

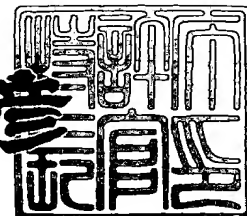
Applicant (s):

中外製薬株式会社

2 0 0 0 年 3 月 1 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特 2 0 0 0 - 3 0 1 2 5 8 7

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-901

【提出日】 平成 9年 7月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/52

【発明の名称】 ビタミンD 1 α 水酸化酵素遺伝子

【請求項の数】 25

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県所沢市元町 1 3 - 2

 【氏名】 加藤 茂明

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都北区豊島 1 - 2 2 - 7 マリポーザ伊勢屋 7 0 1 号

 【氏名】 武山 健一

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都杉並区高円寺南 1 - 2 4 - 1 4 ヴィンテージ高円寺南 5 0 4 号

 【氏名】 北中 幸子

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

 【代表者】 永山 治

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ビタミンD 1 α 水酸化酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核内受容体をコードする遺伝子を有するベクターおよび該核内受容体の結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターが導入された細胞。

【請求項2】 核内受容体がビタミンD受容体である、請求項1に記載の細胞。

【請求項3】 核内受容体のDNA結合ドメインと核内受容体のリガンド結合ドメインとを含む融合タンパク質をコードする遺伝子を有するベクターおよび該核内受容体のDNA結合ドメインの結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターが導入された細胞。

【請求項4】 核内受容体のDNA結合ドメインがGAL4に由来する、請求項3に記載の細胞。

【請求項5】 核内受容体のリガンド結合ドメインがビタミンD受容体に由来する、請求項3に記載の細胞。

【請求項6】 核内受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法であって、

(A) 請求項1乃至5のいずれかに記載の細胞に被検化合物を作用させる工程、

(B) レポーター活性を検出する工程、

(C) レポーター活性が検出された細胞に作用させた被検化合物を選択する工程、
を含む方法。

【請求項7】 被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かを検査する方法であって、

(A) 請求項1乃至5のいずれかに記載の細胞に被検化合物を作用させる工程、

(B) レポーター活性を検出する工程、

を含む方法。

【請求項8】 リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法であって、

- (A) 請求項1乃至5のいずれかに記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、
 - (B) (A)の工程により被検遺伝子が導入された細胞にリガンドの前駆体を作用させる工程、
 - (C) レポーター活性を検出する工程、
 - (D) レポーター活性が検出された細胞から被検遺伝子を単離する工程、
- を含む方法。

【請求項9】 被検遺伝子が、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法であって、

- (A) 請求項1乃至5のいずれかに記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、
 - (B) (A)の工程により被検遺伝子が導入された細胞にリガンドの前駆体を作用させる工程、
 - (C) レポーター活性を検出する工程、
- を含む方法。

【請求項10】 非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法であって、

- (A) 請求項2または5に記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、
 - (B) (A)の工程により被検遺伝子が導入された細胞に非活性型ビタミンD₃を作用させる工程、
 - (C) レポーター活性を検出する工程、
 - (D) レポーター活性が検出された細胞から被検遺伝子を単離する工程、
- を含む方法。

【請求項11】 被検遺伝子が、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法であって、

- (A) 請求項2または5に記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、
- (B) (A)の工程により被検遺伝子が導入された細胞に非活性型ビタミンD₃を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、
を含む方法。

【請求項 12】 請求項 6 に記載の方法により単離しうる、核内受容体に結合するリガンド。

【請求項 13】 請求項 8 に記載の方法により単離しうる、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 14】 請求項 10 に記載の方法により単離しうる、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 15】 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列からなり、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質。

【請求項 16】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列からなり、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質。

【請求項 17】 配列番号：3 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質。

【請求項 18】 配列番号：4 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質。

【請求項 19】 請求項 15 乃至 18 のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項 20】 配列番号：3 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 21】 配列番号：4 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性

を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項22】 請求項19乃至21のいずれかに記載のDNAを含むベクター。

【請求項23】 請求項19乃至21のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。

【請求項24】 請求項23に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項15乃至18のいずれかに記載のタンパク質の生産方法。

【請求項25】 請求項15乃至18のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法、該スクリーニング方法により単離された非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する酵素およびその遺伝子、並びに被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法に関する。また、本発明は上記方法を応用した核内受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法、該スクリーニング方法により単離するリガンド、および被検化合物が核内受容体のリガンドであるか否かを検査する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ビタミンDのホルモン型であり、最も生物学的活性の高い天然の代謝産物である1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃ (1 α ,25(OH)₂D₃) (A. W. Norman, J. Roth, L. Orchi, Endocr Rev. 3, 331 (1982); H. F. DeLuca, Adv Exp Med Biol. 196, 361 (1986); M. R. Walters, Endocr Rev. 13, 719 (1992))は、連続的な水酸化によって生成される。すなわち、まず最初に肝臓で水酸化されて25-ヒドロキシビタミンD₃ (25(OH)D₃) が生じ、続いて腎臓で水酸化されて1 α ,25(OH)₂D₃ が生じる (H. Kawashima, S. Torikai, K. Kurokawa, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 78, 1199 (1981); H. L. Henry et al., J. CellBiochem. 49, 4 (1992))。ビタミンD受容体(以下、「VDR」と略記する)へ $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が結合することによってVDRのトランス活性化作用が引き起こされ(M. Beato, P. Herrlich, G. Schuts, Cell 83, 851 (1995); H. Darwish and H. F. DeLuca, Eukaryotic Gene Exp. 3, 89 (1993); B. D. Lemon, J. D. Fondell, L. P. Freedman, Mol. Cell. Biol. 17, 1923 (1997))、その結果として、カルシウムホメオスタシス、細胞分裂及び細胞増殖のようなビタミンDの作用の大部分を行う一連の標的遺伝子の転写が調節される(D. D. Bikle and S. Pillai, Endoc. Rev. 14, 3 (1992); R. Bouillon, W. H. Okamura, A. W. Norman, Endoc. Rev. 16, 200 (1995); M. T. Haussler et al., Recent Prog. Horm. Res. 44, 263 (1988); P. J. Malloy et al., J. Clin. Invest. 86, 2071 (1990))。腎における $25(\text{OH})\text{D}_3$ の水酸化が、活性ビタミンDの合成に重要であることが示されており、それは、腎臓の近位尿細管に特に局在している $25(\text{OH})\text{D}_3$ 1α 水酸化酵素($1\alpha(\text{OH})$ アーゼ)によって行われる、とかなり以前より考えられている。腎の $1\alpha(\text{OH})$ アーゼの活性は、その最終産物である $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により負の調節を受け(Y. Tanaka and H. F. DeLuca, Science 183, 1198 (1974); K. Ikeda, T. Shinki, A. Yamaguchi, H. F. DeLuca, K. Kurokawa, T. Suda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6112 (1995); H. L. Henry, R. J. Midgett, A. W. Norman, J. Biol. Chem. 249, 7584 (1974))、カルシトニン及びPTHのようなカルシウム調節に関与するペプチドホルモンにより正の調節を受ける(H. Kawashima, S. Torikai, K. Kurokawa, Nature 291, 327 (1981); K. W. Colston, I. M. Evans, L. Galauto, I. Macintyre, D. W. Moss, Biochem. J. 134, 817 (1973); D. R. Fraser and E. Kodicek, Nature 241, 163 (1973); M. J. Beckman, J. A. Johnson, J. P. Goff, T. A. Reinhardt, D. C. Beitz, R. L. Horst, Arch. Biochem. Biophys. 319, 535 (1995))。これらのホルモンによる $1\alpha(\text{OH})$ アーゼ活性の複雑な調節によって、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の血清レベルは、最終的には一定に維持されている。ビタミンDの作用においてこの酵素がインビボで重要であることは、遺伝子病、ビタミンD依存性I型くる病(D. Fraser, S. W. Kooh, H. P. Kind, M. F. Hollick, Y. Tanaka, H. F. DeLuca, N. Engl. J. Med. 289, 817 (1973); S. Balsan, in Rickets, F. H. Glorie

ux, Ed. (Raven, New York, 1991), ppl55165.)の原因が 1α (OH)アーゼ遺伝子の突然変異であると考えられることから、さらに明白である。部分精製した 1α (OH)アーゼ蛋白質の生化学的解析(S. Wakino et al, Gerontology 42, 67 (1996); Eva Axen, FEBS lett 375, 277 (1995); M. BurgosTrinidad, R. Ismaili, R. A. Ettinger, J. M. Prahl, H. F. DeLuca, J. Biol. Chem. 267, 3498 (1992); M. Warner et al., J. Biol. Chem. 257, 12995 (1982))により、この酵素がP450ファミリーに属することが強く示唆されたが、この生化学的特性、及び $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により負のフィードバックが発現する分子的機構については、酵素の精製が困難であり、cDNAがクローニングされていないことから、不明な点が多い。そこで、これまで 1α (OH)アーゼのcDNAの単離が望まれてきた。近年になってラットにおいてビタミンDの 1α 位を水酸化する酵素が単離されたという報告がなされている(J. Bone Min. Res. Vol11(sup1)117(1996))。

【0003】

ところで、上記の 1α (OH)アーゼも含め、特定の核内受容体に直接もしくは間接的に作用するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする従来の方法としては、主として細胞内情報伝達因子のリン酸化や膜受容体のイオンチャンネルなどを指標とした手法が用いられてきた。具体的には、適当な発現ベクターに挿入されたcDNAライブラリーやcDNAを細胞や単一な個体(例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞など)に導入し、リン酸化、細胞増殖、イオンチャンネルを介した電流の変化を指標としたスクリーニングが行われていた。

【0004】

しかしながら、これらの方法で目的の遺伝子を単離することは非常に困難であった。特に、酵素自身の発現クローニングは検出可能な指標が限られているため、高度な手法が要求されていた。このため簡便かつ効率的なスクリーニング方法の開発が望まれていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子を簡便かつ効率的にスクリーニングする方法、および被検遺伝子がリガンド

の前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを簡便に検査する方法を提供することを課題とする。また、該スクリーニング法を用いてリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質およびその遺伝子を単離することを課題とする。さらに、上記のスクリーニング法および検査法を応用した核内受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法、および被検化合物が核内受容体のリガンドであるか否かを検査する方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記課題を解決すべく、リガンドの結合により転写因子として機能する核内受容体の特性に着目して鋭意研究を行った結果、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質の発現によってリガンドが生成された場合に、該リガンドが核内受容体と結合し、その標的配列の下流のレポーター遺伝子を発現させるシステムの構築に成功した。さらに、このシステムを利用して遺伝子ライブラリーの検索を行い、実際にリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子を単離することに成功した。

【0007】

具体的には、本発明者等は、GAL4のDNA結合ドメインとビタミンD受容体のリガンド結合ドメインとを含む融合タンパク質をコードする遺伝子を有するベクター、およびGAL4のDNA結合ドメインの結合配列の下流にレポーターであるlacZ遺伝子が接続されているベクターを構築し、これらベクターを細胞へ導入した。次いで、これら細胞にcDNAライブラリーを導入し、ビタミンD前駆体を添加して、レポーター活性の検出を行った。そして、レポーター活性の検出されたクローンを選抜し、選抜したクローンが実際にビタミンD前駆体をビタミンDへ変換する活性を有するか否かにつき検討を行ったところ、単離したクローンの1つが実際にこの活性を有することを見いだした。さらに、本発明者らは、核内受容体の転写制御を利用したこのシステムを応用すれば、核内受容体に結合するリガンドのスクリーニングや被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かの検査を行うことが可能であることを見いだした。即ち、上記システムにおいて、リガ

ドの前駆体および該前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子を含む遺伝子のライブラリーに代えて、例えば、被検化合物のライブラリーを用いれば、被検化合物がリガンドとして機能した場合に、核内受容体がレポーター遺伝子の転写を促進するため、被検化合物のライブラリー中からリガンドとして機能する化合物を簡便に検出し、スクリーニングすることが可能であることを見いだした。

【0008】

本発明は、より具体的には、

- (1) 核内受容体をコードする遺伝子を有するベクターおよび該核内受容体の結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターが導入された細胞、
- (2) 核内受容体がビタミンD受容体である、(1)に記載の細胞、
- (3) 核内受容体のDNA結合ドメインと核内受容体のリガンド結合ドメインとを含む融合タンパク質をコードする遺伝子を有するベクターおよび該核内受容体のDNA結合ドメインの結合配列の下流にレポーター遺伝子が接続されているベクターが導入された細胞、
- (4) 核内受容体のDNA結合ドメインがGAL4に由来する、(3)に記載の細胞、
- (5) 核内受容体のリガンド結合ドメインがビタミンD受容体に由来する、(3)に記載の細胞、
- (6) 核内受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法であって、
 - (A) (1)乃至(5)のいずれかに記載の細胞に被検化合物を作用させる工程、
 - (B) レポーター活性を検出する工程、
 - (C) レポーター活性が検出された細胞に作用させた被検化合物を選択する工程、
 を含む方法、
- (7) 被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かを検査する方法であって、

(A) (1) 乃至 (5) のいずれかに記載の細胞に被検化合物を作用させる工程、

(B) レポーター活性を検出する工程、
を含む方法、

(8) リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法であって、

(A) (1) 乃至 (5) のいずれかに記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程

(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞にリガンドの前駆体を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、

(D) レポーター活性が検出された細胞から被検遺伝子を単離する工程、
を含む方法、

(9) 被検遺伝子が、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法であって、

(A) (1) 乃至 (5) のいずれかに記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程

(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞にリガンドの前駆体を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、

を含む方法、

(10) 非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法であって、

(A) (2) または (5) に記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、

(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞に非活性型ビタミンD₃を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、

(D) レポーター活性が検出された細胞から被検遺伝子を単離する工程、
を含む方法、

(11) 被検遺伝子が、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法であって、

(A) (2) または (5) に記載の細胞に被検遺伝子を導入する工程、

(B) (A) の工程により被検遺伝子が導入された細胞に非活性型ビタミンD₃を作用させる工程、

(C) レポーター活性を検出する工程、
を含む方法、

(12) (6) に記載の方法により単離しうる、核内受容体に結合するリガンド、

(13) (8) に記載の方法により単離しうる、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子、

(14) (10) に記載の方法により単離しうる、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換するタンパク質をコードする遺伝子、

(15) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列からなり、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質、

(16) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列からなり、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質、

(17) 配列番号：3 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質、

(18) 配列番号：4 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質、

(19) (15) 乃至 (18) のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、

(20) 配列番号：3 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタン

パク質をコードするDNA、

(21) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質をコードするDNA、

(22) (19)乃至(21)のいずれかに記載のDNAを含むベクター、

(23) (19)乃至(21)のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、

(24) (23)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(15)乃至(18)のいずれかに記載のタンパク質の生産方法、

(25) (15)乃至(18)のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体

に関する。

【0009】

なお、本発明において「リガンド」とは、核内受容体に結合することにより、核内受容体の標的遺伝子の転写活性化能を制御する化合物を指し、天然に存在するものに限られず、人工的に合成されたものも含まれる。また、本発明において「核内受容体」とは、標的遺伝子のプロモーター上流に結合することにより、リガンド依存的に標的遺伝子の転写を制御する因子を指す。さらに、本発明における「リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質」には、リガンド前駆体に直接作用してリガンドへ変換するタンパク質のみならず、間接的に変換するタンパク質、例えば、リガンドの前駆体に直接作用しリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質を活性化するタンパク質も含まれる。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明は、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法、被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法に関する。これら方法においては、まず、核内受容体をコードする遺伝子を有するベクター（以下、「第一発現ユニット」と称する）、および該核内受容体の結合配列の下流

にレポーター遺伝子が接続されているベクター（以下、「第二発現ユニット」と称する）が導入された細胞を調製し、該細胞に被検遺伝子を導入する。

【0011】

第一発現ユニットにおける「核内受容体をコードする遺伝子」としては、特に制限はなく、種々の核内受容体の遺伝子を用いることが可能である。例えば、後述する核内受容体に結合する未知のリガンドのスクリーニングや被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かの検査において、核内受容体として、PPAR、LXR、FXR、MB67、ONR、NUR、COUP、TR2、HNF4、ROR、Rev-erb、ERR、Ftz-F1、Tlx、GCNFなどのオーファン受容体（蛋白質 核酸 酵素 Vol.41 No.8 p1265-1272(1996)）を用いれば、その天然または人工的に合成されたりガンドを検出し、単離することができる。また、後述するリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニング、被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かの検査などに用いる場合には、そのリガンドおよびリガンドの前駆体が知られているVDR（ビタミンD受容体）、ER、AR、GR、MRなどの核内受容体（蛋白質 核酸 酵素 Vol.41 No.8 p1265-1272(1996)）が好適に用いられる。但し、本発明に用いられる核内受容体はこれら例示した核内受容体に制限されるものではない。

【0012】

本発明においては、これら核内受容体の遺伝子をそのまま用いることも可能であるが、核内受容体のDNA結合ドメインと他の核内受容体のリガンド結合ドメインとを含む融合蛋白質の遺伝子を用いることも可能である。例えば、DNA結合ドメインとしては、下流のレポーター遺伝子の発現を高めるため、GAL4のDNA結合ドメインなどが好適に用いられる。

【0013】

また、第二発現ユニットにおける「核内受容体の結合配列」としては、核内受容体の種類に応じて変動するが、多くの核内受容体においては、通常「AGGTCA」を含む配列が用いられる。2量体を形成する核内受容体においては、この配列は2回の繰り返し配列であることが好ましい。繰り返し配列としては、核内受容体の種類に応じて配列が同方向に並んだダイレクトリピート型や配列が中心方向に向

かうパリンドローム型などが挙げられる（蛋白質 核酸 酵素 Vol.41 No.8 p1265-1272(1996)）。この繰り返しの間には通常スペーサー配列が存在し、これにより核内受容体の特異性を決定し得る（K.Umesono et al, Cell Vol.65 p1255-1266 (1991)）。

【0014】

また、核内受容体の結合配列の下流の「レポーター遺伝子」としては、特に制限はないが、好適なレポーター遺伝子としては、例えば、lacZ、CAT、ルシフェラーゼが挙げられる。その他、毒物や抗生物質に対する耐性遺伝子、例えば、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子などを用い、細胞にこれら遺伝子に対応する毒物や抗生物質を添加して細胞を選抜することも可能である。

【0015】

なお、核内受容体の結合配列とレポーター遺伝子は直結している必要はなく、その間に、プロモーターの強度を強度を改変する配列（例えば、 β -グロビンのプロモーター領域）などが挿入されていてもよい。

【0016】

これら発現ユニットが導入される細胞としては、動物細胞が好ましい。特に、形質転換効率の高いCOS-1細胞やHeLa細胞が好適である。発現ユニットを構成するベクターとしては、動物細胞用のベクターが好ましく、例えば「pcDNA3」（in vitrogen社製）が挙げられる。ベクターの宿主細胞への導入は、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法など当業者に公知の方法により行うことが可能である。

【0017】

これにより調製された細胞に被検遺伝子が導入される。被検遺伝子としては、特に制限はなく、リガンドの前駆体をリガンドへ変換させる能力を検出したい所望の遺伝子を用いることが可能である。遺伝子のスクリーニングを行う場合には、目的の遺伝子を発現していることが予想される細胞、組織などから単離したmRNAを基に調製したcDNAライブラリーなどが用いられる。例えば、ビタミンD前駆体を活性型ビタミンDへ変換するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニン

グの場合には、腎臓由来のcDNAライブラリーなどが用いられる。なお、ビタミンD前駆体を活性型ビタミンDへ変換するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングの場合には、効率よく活性型ビタミンDが生成するようにアドレノドキシン(ADX)の発現ベクターおよびアドレノドキシン還元酵素(ADR)の発現ベクターを被検遺伝子と共に導入すると好ましい。被検遺伝子は、適当な発現ベクターに挿入して細胞に導入しうる。ベクターとしては、例えば、上記した「pcDNA3」(invitrogen社製)などが好適である。

【0018】

次いで、被検遺伝子が導入された細胞にリガンドの前駆体を作用させる。リガンドの前駆体としては、通常、上記第一発現ユニットにより発現する核内受容体に作用するリガンドの前駆体を用いる。リガンドの前駆体の具体例を示せば、VD_Rのリガンド(活性型ビタミンD($1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$))の前駆体である25-ヒドロキシビタミンD₃、ERのリガンド(エストロゲン)およびARのリガンド(ジヒドロキシテストステロン)の前駆体であるテストステロン、GRのリガンド(コルチゾール)の前駆体である11デオキシコルチゾール、MRのリガンド(アルドステロン)の前駆体であるコルチコステロンなどが挙げられるが、これらに制限されない。細胞へのリガンドの前駆体の作用は、細胞を培養している培地にリガンドを添加するなどの方法で行うことが可能である。

【0019】

次いで、レポーターの活性を検出する。導入した被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードしていれば、添加したリガンドの前駆体からリガンドが生成し、これが核内受容体に結合し、形成されたりリガンドと核内受容体との複合体がその標的配列に結合してレポーター遺伝子を発現させる。一方、導入した被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードしていなければ、リガンドの前駆体からリガンドが生成されないため、レポーター遺伝子は発現しない。このため、レポーター活性の検出により細胞へ導入した被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードしているか否かを判断することが可能である。なお、レポーター活性の検出は、レポーター遺伝子の種類に応じ、染色、蛍光、細胞の生死などを指標に当業

者に公知の方法で行うことができる。

【0020】

被検遺伝子として、単一の遺伝子ではなく、遺伝子のライブラリーなどを用いた場合には、次いで、レポーター活性が検出された細胞を選択し、該細胞から被検遺伝子を単離する。細胞からの被検遺伝子の抽出は、例えば、文献「H.S.Tong et al. Journal of Bone and Mineral Research Vol.9,577-584(1994)」に記載の方法より行うことができる。抽出した遺伝子は、例えば、ジデオキシ法など公知の方法によりその一次構造を決定することが可能である。

【0021】

第一発現ユニットと第二発現ユニットが導入された細胞は、リガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングや被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドに変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かの検査に利用する以外にも、例えば、核内受容体に結合するリガンドのスクリーニングや被検化合物が核内受容体に結合するリガンドであるか否かの検査に応用することが可能である。即ち、上記細胞に、リガンドの前駆体および該前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子の候補（単一の候補遺伝子や遺伝子ライブラリーなど）に代えて、例えば、核内受容体に作用するリガンドの候補（単一の被検化合物や被検化合物のライブラリー）を用いれば、被検化合物がリガンドとして機能した場合に、核内受容体と被検化合物（リガンド）との複合体がその標的配列の下流のレポーターを活性化するため、被検化合物がリガンドとして機能する化合物であるか否かを簡便に検出することが可能であり、またレポーターの活性化を指標に複数の被検化合物の中からリガンドとして機能する化合物をスクリーニングすることも可能である。

【0022】

本発明者等は、上記のリガンドの前駆体をリガンドへ変換する酵素をコードする遺伝子のスクリーニングの一例として、ビタミンDの前駆体を活性型ビタミンDへ変換するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングを行い、目的の遺伝子を得た。本発明は、また、これにより得られたビタミンDの前駆体を活性型ビタミンDへ変換するタンパク質およびその遺伝子に関する。

【0023】

本発明のタンパク質に含まれる、ビタミンDの前駆体を活性型ビタミンDへ変換するマウスおよびヒト由来のタンパク質をそれぞれ配列番号：1と配列番号：2に示す。ビタミンDは、最初に肝臓で水酸化されて $25(\text{OH})\text{D}_3$ が生じ、続いて腎臓で水酸化されて $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が生じるが、本発明のタンパク質は、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ を水酸化して $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に変換するタンパク質、即ち、ビタミンDの 1α 位を水酸化するタンパク質（ $1\alpha(\text{OH})$ アーゼ）である。

【0024】

本発明のタンパク質は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組み換えタンパク質として調製することも可能である。本発明のタンパク質にはこれら双方のタンパク質が含まれる。天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、後述の本発明のタンパク質に結合する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより腎臓細胞の抽出液などから単離することが可能である。一方、組み換えタンパク質であれば、後述するように本発明のタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。

【0025】

また、当業者であれば、公知の方法を用いて配列番号：1または配列番号：2に記載のタンパク質中のアミノ酸を適宜置換などを行い、これと実質的に同等の生物学的活性を有するタンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加などにより配列番号：1または配列番号：2に記載のタンパク質に対してアミノ酸配列が改変された改変体であって、非活性型ビタミン D_3 を活性型ビタミン D_3 に変換する活性を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、文献「新細胞工学実験プロトコル 東京大学医科学研究所 制癌研究部編 p241-248」に記載の方法が挙げられる。また、市販の「QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit」（stratagene社製）を利用して変異を導入することも可能である。

【0026】

また、当業者にとっては、周知技術であるハイブリダイゼーション技術 (K. Ebihara et al. Molecular and Cellular Biology, Vol. 9, 577-584 (1994)) などを用いて、マウス由来のタンパク質をコードする配列番号：3 (またはヒト由来のタンパク質をコードする配列番号：4) に記載のDNA配列 (またはその一部) を基に、他の生物からこれと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のタンパク質と実質的に同等の活性を有するタンパク質を得ることも常套手段である。従って、配列番号：3 (または配列番号：4) に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。ハイブリダイズするDNAを単離する他の生物としては、例えば、ラットやサルなどが挙げられる。なお、配列番号：1 (または配列番号：2) に記載のタンパク質と実質的に同等の生物学的活性を有するタンパク質をコードするDNAは、通常、配列番号：3 (または配列番号：4) に記載のDNAと高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも70%以上、好ましくは少なくとも80%以上、さらに好ましくは少なくとも90%以上の配列の同一性を指す。このようなDNAを単離するための具体的な方法の一例を示せば、以下の如くである。配列番号：3 (またはヒト由来のタンパク質をコードする配列番号：4) に記載のDNA配列を鋳型として³²Pで放射標識し、目的とした種のcDNAライブラリーよりスクリーニングする。ハイブリダイズの条件としては、通常、10%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件で行う。好ましい条件としては、25%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件であり、さらに好ましい条件としては、50%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件である。

【0027】

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、cDNAでも、ゲノムDNAでもよく、また合成DNAであってもよい。本発明のDNAは、上記した本発明のタンパク質と実質的に同様の活性を有するタンパク質を他の生物から単離するために用いられる他、本発明のタンパク質を組み換えタンパク質として生産するためにも利用しうる。即ち、本発明のタンパク質をコ

ードするDNA（例えば、配列番号：3または配列番号：4に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させタンパク質を精製することにより本発明のタンパク質を組み換えタンパク質として調製することが可能である。

【0028】

組み換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、大腸菌や動物細胞が挙げられる。細胞内で組み換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、大腸菌であればpGEX（ファルマシア社製）、pET（ノバーゲン社製）が好適に用いられ、動物細胞であればpcDNA3（インビトロゲン社製）が好適に用いられる。これらベクターの宿主細胞への導入は、例えば、熱ショックなど用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組み換えタンパク質の精製は、例えば、pGEX（ファルマシア社製）を用いた場合にはグルタチオンセファロースアフィニティークロマトグラフィーにより、またpET（ノバーゲン社製）を用いた場合にはニッケルアガロースアフィニティークロマトグラフィーにより容易に行うことができる。

【0029】

また、当業者であれば、調製した本発明のタンパク質を用いてこれに結合する抗体を調製することも容易に行いうる。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質をウサギなどに注入し、硫酸沈殿によりIG画分を精製するなど公知の方法で調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質で免疫されたマウスの脾細胞を用いて骨髓腫細胞とのハイブリドーマを調製し、培養液中に分泌されるモノクローナル抗体を得て、さらに腹腔内に注入して大量のモノクローナル抗体を得るなどの方法で調製することが可能である。

【0030】

本発明のタンパク質、DNA、または抗体の具体的な応用例としては、以下が挙げられる。本発明のタンパク質やDNAは、例えば、 1α 水酸化酵素欠損症患者あるいは腎不全患者などの 1α 水酸化酵素の活性が低い患者の治療および／または診断に利用することも可能である。本発明者等はビタミンD依存症I型患者で本発明

のDNAの変異、具体的には、P382S(CCTからTCTへの変異)、R335P(CGGからCCGへの変異)、G125E(GGAからGAAへの変異)、R107H(CGCからCACへの変異)を同定しており、これら患者の治療にも利用可能である。なお、これら患者の変異は、患者の末梢血白血球よりDNAを抽出し、各エクソンをイントロンに設定したプライマーを用いてPCRにて増幅した後、直接シーケンス法にて塩基配列を決定することにより同定することが可能である。本発明のDNAを遺伝子治療目的で利用する場合には、本発明のDNAは適当なベクターに組み込み、レトロウイルス法、リポソーム法、アデノウイルス法などを用いて、*in vivo*法や*ex vivo*法により体内に導入される。本発明のタンパク質は、上記以外にも、例えば、固定化酵素として用いて活性型ビタミンD誘導体の製造（ 1α 位に水酸基が存在しないビタミンDおよびビタミンD誘導体の、 1α 位の水酸化）に用いることも可能である。また、本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製に用いられる他、ビタミンD過剰状態、肉芽腫性疾患、リンパ腫などの治療にも利用しうる。

【0031】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0032】

【実施例】

【実施例1】 ビタミンDの 1α 位を水酸化する酵素をコードするcDNAの単離

1α (OH)アーゼをコードする全長cDNAをクローン化するために、本発明者らは核受容体を介した発現クローニング系を開発した。この系は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の前駆体である $25(\text{OH})\text{D}_3$ が、 1α (OH)アーゼ活性が存在する場合だけVDRのトランス活性化機能を活性化しうることを基礎としている（図1）。すなわち、VDR(AF-2)のリガンド依存性トランス活性化機能は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によって誘導されるが、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ によっては誘導されない。 1α (OH)アーゼが発現している細胞でのみ、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ が $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ へと転化されるため、該細胞は、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ の存在下でlacZレポーター遺伝子が発現する結果としてX-gal染色(M.A.Frederick et al., Current Protocols in Molecular biology(Wiley, New York, 1995))によって検出することができる。

【0033】

7週めのVDR欠失マウス(VDR-/-マウス)の腎臓では、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の血清濃度が著しく高いことから(図2)、 $1\alpha(\text{OH})$ アーゼ活性が高いと考えられるため、7週めのVDR-/-マウスの腎臓を発現ライブラリーの調製に用いた。ポリ(A)⁺RNAを精製し(K. Takeyama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 222, 395 (1996); H. Mano et al., J. Biol. Chem. 269, 1591 (1994))、それを用いて全cDNAを調製した(U. Gubler and B. J. Hoffmann, Gene 25, 263 (1983); M. Kobori and H. Nojima, Nucleic Acid Res. 21, 2782 (1993))。全cDNAを、SV40を起源とするCOS-1細胞内で自律複製できる哺乳動物発現ベクター、pcDNA3 (invitrogen社製)のHindIII部位に挿入した。酵母のGAL4(UAS)×2及びβ-グロブリンプロモーターをBasic発現ベクター(Clontech社製)のマルチクローニングサイトに挿入することによって、レポータープラスミド17M2-G-lacZを構築した。GAL4 DNA結合ドメインと融合したVDRリガンド結合ドメイン(VDR-DEF) [GAL4-VDR(DEF)] (K. Ebihara et al., Mol. Cell. Biol. 16, 3393 (1996); T. Imai et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 233, 765 (1997))を用いて、リガンドにより誘導されるAF-2の機能を検出した。10%の胎児牛血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で培養したCOS-1細胞に、0.5 μgのGAL4-VDR(DEF)発現ベクター、1 μgの17M2-G-lacZ、それぞれ0.2 μgのADX発現ベクター及びADR発現ベクター(T. Sakaki, S. Kominami, K. Hayashi, M. AklyoshiShibata, Y. Yabusaki, J. Biol. Chem. 271, 26209 (1996); F. J. Dilworth et al., J. Biol. Chem. 270, 16766 (1995))、0.1 μgの発現cDNAライブラリーを、cDNA発現ライブラリーと共に、リポフェクチン試薬(GIBCO BRL社製)を用いて、一時的に形質転換した。形質転換から12時間後、 10^{-8}M の $25(\text{OH})\text{D}_3$ を培地に添加し、形質転換から48時間後、細胞を0.05%のグルタルアルデヒドで固定し、X-galと共に37℃で4時間インキュベートすることにより、 $1\alpha(\text{OH})$ アーゼ活性の発現を示すβ-ガラクトシダーゼに陽性な細胞をX-gal染色によって同定した(図3(c)) (M. A. Frederick et al., Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York, 1995)参照)。なお、ネガティブコントロールでは、発現cDNAライブラリーを省略し(図3(a))、ポジティブコントロールでは、発現ライブラリーを省略し、さらに $25(\text{OH})\text{D}_3$ の代わりに

1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ を添加した(図3(b))。

【0034】

染色された細胞を、直径40 μ mのマイクロピペットを用いて倒立顕微鏡下でマイクロマニピュレーションによって選択的に集め(H. S. Tong et al., J. Bone Miner. Res. 9, 577 (1994)参照)、PCR用の反応緩衝液に移した。PCR産物を1%アガロースゲル上で泳動させ、2.0から2.5kb付近のフラグメント(予想される全長1 α (OH)アーゼcDNAの大きさ)を精製し、pcDNA3内にサブクローン化した。ランダムな64クローンから単離したcDNAの配列解析で、13クローンが同一の完全なORFをコードすることが示された。この単一なcDNAクローンを再導入したCOS-1細胞は、X-gal染色に陽性であった(図3(d))。

【0035】

このcDNAをプローブとして用いた、同一ライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションスクリーニングによって、全長cDNAが得られた。ORFから推定されるアミノ酸配列は、507アミノ酸からなる新規な蛋白質を構成している(図4)。

【0036】

このタンパク質(以後、「CYP1AD」と呼ぶ)は、ミトコンドリア標的シグナルを有し、さらに、P450ファミリーのメンバーと有意な相同性を示す(D. W. Nebert, DNA Cell Biol. 10, 1 (1991)参照)。特に、ラットのビタミンD $_3$ 25-水酸化酵素との相同性は、41.7%であり、マウスの25(OH)D $_3$ 24-水酸化酵素との相同性は、31.6%である(図5)(O. Masumoto, Y. Ohyama, K. Okuda, J. Biol. Chem. 263, 14256 (1988); E. Usui, M. Noshiro, Y. Ohyama, K. Okuda, FEBS Lett. 262, 367 (1990); Y. Ohyama and K. Okuda, J. Biol. Chem. 266, 8690 (1991); S. Itoh et al., Biochem. Biophys. Acta. 1264, 26 (1995)参照)。特によく保存されたドメイン、ステロール結合ドメインの相同性はそれぞれ93%、60%であり、ヘム結合ドメインの相同性はそれぞれ70%、80%である。

【0037】

網状赤血球溶解系(Promega社製)を用いて [35 S]メチオニンの存在下でインビトロ翻訳させた「CYP1AD」蛋白質を、10%SDS-PAGEにより解析したところ(H. Sasaki et al., Biochemistry 34, 370 (1995)参照)、その分子量は、およそ55kDa

であり(図6)、部分精製された 1α (OH)アーゼの分子量と一致していた(S. Waki no et al, Gerontology 42, 67 (1996); Eva Axen, FEBS lett 375, 277 (1995); M. Burgos-Trinidad, R. Ismail, R. A. Ettinger, J. M. Prahl, H. F. DeLuca, J. Biol. Chem. 267, 3498 (1992); M. Warner et al., J. Biol. Chem. 257, 12995 (1982)参照)。

【0038】

[実施例2] 「CYP1AD」のインビボにおける活性の検出

「CYP1AD」が、インビボで、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ を活性型ビタミンDに転化することによって、VDRのトランス活性化機能を活性化する能力を持つことを確かめるために、 $0.5\mu\text{g}$ のGAL4-VDR(DEF)発現ベクター、 $1\mu\text{g}$ の17M2-G-CAT(S.Kato et al., Science 270, 1491(1995))、それぞれ $0.5\mu\text{g}$ のADX発現ベクター、ADR発現ベクター(T. Sakaki, S. Kominami, K. Hayashi, M. Akiyoshi-Shibata, Y. Yabusaki, J. Biol. Chem. 271, 26209 (1996); F. J. Dilworth et al., J. Biol. Chem. 270, 16766 (1995))、 $1\mu\text{g}$ のCYP1AD発現ベクターを、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ または $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の存在化で、COS-1細胞に同時形質転換した。1つの代表的なCATアッセイを図7の下図に示す。また、CAT比活性を、3つの独立した実験についての平均値およびSEMとして図7の上図に示す。「CYP1AD」発現ベクターを用いない場合は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のみが、CATレポーター遺伝子を活性化したが、「CYP1AD」を発現させた場合には、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ がレポーター遺伝子を活性化することができた。しかしながら、ADX又はADRの非存在下では、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ による有意な活性化が見られなかった。これらの結果から、「CYP1AD」が $25(\text{OH})\text{D}_3$ を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に転化する 1α (OH)アーゼであることが強く示唆される。

【0039】

[実施例3] 「CYP1AD」の生成物の化学的分析

「CYP1AD」による酵素生成物を化学的に決定するために、順相HPLC及び逆相HPLCを行った(E. B. Mawer et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 79, 554 (1994); H. Fujii et al., EMBOJ, in press, (1997)参照)。 $[^3\text{H}] 25(\text{OH})\text{D}_3$ (10^5dpm ; 6.66テラベクレル/mmol, Amersham International)を、ADR発現ベクター及びARX発現ベクターと、CYP1AD発現ベクターを形質転換した(図8(b))または形質転換

していない(図8(c))細胞(5×10^6)と共に、37℃で6時間インキュベートした。培養した培地をクロロホルムで抽出し、移動相としてヘキサン/イソプロパノール/メタノール(88:6:6)を用いたTSKゲルシリカ150カラム(4.6x250mm、トーソー)による順相HPLCで、流速1.0ml/分で分析した。溶離した画分を集め、その放射能を液体シンチレーションカウンターによって計測した(E. B. Mawer et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 79, 554 (1994); H. Fujii et al., EMBOJ, in press, (1997))。標品のビタミンD誘導体[$1\alpha, (OH)D_3$ 、 $25(OH)D_3$ 、 $24,25(OH)_2D_3$ 、 $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ 及び $1\alpha, 24,25(OH)_3D_3$]をクロマトグラフィーにかけ、これらビタミンD誘導体のリテンションタイムを264nmのUV吸収により決定した(図8(a))。

【0040】

上記の順相HPLCと同様にして、逆相HPLCを行った。「Cosmasil 5C18-AR」を充填したカラム(4.6x150mm、ナカライテスク社)を用いて、移動相の流速1.0ml/分で、 $[^3H]1\alpha, 25(OH)_2D_3$ の存在を確かめた。標品のビタミンD誘導体を図9(a)に、「CYP1AD」の存在下または非存在下での反応生成物のクロマトグラムを、それぞれ図9(b)、図9(c)に示す。

【0041】

酵素生成物の、順相HPLC及び逆相HPLCにおけるリテンションタイムは、標品の $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ のリテンションタイムと完全に一致した。このことから、「CYP1AD」のcDNAは、 $25(OH)D_3$ を $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ に水酸化するマウスの $1\alpha(OH)$ アーゼをコードすることが立証された。

【0042】

[実施例4] 「CYP1AD」転写産物の組織分布の解析

7週目の正常マウス及びVDR-/-マウスの「CYP1AD」転写産物の組織分布について調査した。脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、骨格筋、皮膚、骨由来のポリ(A)⁺RNAを抽出し、プローブとして「1CYP1AD」及び β -アクチンのcDNAを用いたノーザンブロットにより解析した(K. Takeyama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 222, 395 (1996); H. Mano et al., J. Biol. Chem. 269, 1591 (1994))。その結果、「CYP1AD」の転写産物は腎臓に単一のバンドとして検出さ

れ、その転写産物の大きさ(2.4kbp)はクローン化されたcDNAの大きさと一致した(図10)。腎外のいくつかの組織で 1α (OH)アーゼ活性が報告されているが(A. W. Norman, J. Roth, L. Orchi, *Endocr Rev.* 3, 331 (1982); H. F. DeLuca, *Adv Exp Med Biol.* 196, 361 (1986); M. R. Walters, *Endocr Rev.* 13, 719 (1992); G. A. Howard, R. T. Turner, D. J. Sherrard, D. J. Baylink, *J. Biol. Chem.* 256, 7738 (1981); T. K. Gray, G. E. Lester, R. S. Lorenc, *Science* 204, 1311 (1979))、 1α (OH)アーゼの転写産物は腎以外の組織では検出レベルになかった。

【0043】

「CYP1A_D」遺伝子及び24(OH)アーゼ(CYP24)遺伝子の発現のノーザンブロット解析を、過剰量の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与した(50ng/匹)(+)、または投与していない(-)、3週目及び7週目のVDR+/+マウス、VDR+/-マウス、VDR-/-マウスで行った。代表的なノーザンブロット解析を図11に示した。1グループ5匹以上のマウスの、 β -アクチン転写産物で標準化した水酸化酵素遺伝子の相対量を計測した(図12)。興味深いことに、VDR-/-マウス(3及び7週齢)で、この遺伝子の著しい誘導が見られた(3週目のマウスではおよそ2.5倍、7週目のマウスでは50倍)(図11及び図12)。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与によってVDR+/+マウス及びVDR+/-マウスでは 1α (OH)アーゼ遺伝子発現が有意に抑制されたが、3週目及び7週目のVDR-/-マウス内では抑制されなかった。従って、7週目のVDR-/-マウスの血清の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ レベルが通常よりも高いことは(図2)、 1α (OH)アーゼの過剰発現のためであるらしい。これらの結果を考え合わせると、リガンドが結合したVDRが、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による 1α (OH)アーゼ遺伝子の発現の負の調節に関連していると考えられる。VDR-/-マウスでは、24(OH)アーゼ遺伝子の発現は、検出不可能なレベルまで低下し、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する反応は見られなかった(図11及び12)。24(OH)アーゼ遺伝子は、ビタミンDの不活性型である $24, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に $25(\text{OH})\text{D}_3$ を転化するものであり、その遺伝子発現は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によって正に調節されている。これらの結果から、リガンドが結合したVDRが、24(OH)アーゼ遺伝子のプロモーター内のビタミンD応答エレメントを通じて $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が誘導する遺伝子の発現に関わっていることが確認された(C. Zierold, H. M. Darwish, H. F

. DeLuca, J. Biol. Chem. 270, 1675 (1995); Y. Ohyama et al., J. Biol. Chem. 269, 10545 (1994)). これらの結果は、リガンドが結合したVDRが、 $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ による $1\alpha(OH)$ アーゼ及び $24(OH)$ アーゼの遺伝子発現の調節に反対の方法で関わっていることを示している。

【0044】

【実施例5】 ビタミンDの 1α 位を水酸化する酵素をコードするヒト遺伝子の単離

マウス 1α 水酸化酵素のSacII(500bp)-EcoRI(1200bp)断片をプローブとし、ヒト正常腎組織よりpolyA RNAを抽出して、ラムダZAPIIに組み込んで作製した正常ヒト腎臓cDNAライブラリーのブランクハイブリダイゼーション法によるスクリーニングにてビタミンDの 1α 位を水酸化する酵素をコードするヒト遺伝子を取得した。単離した遺伝子の塩基配列を配列番号：4に、推定アミノ酸配列を配列番号：2に示す。

【0045】

【発明の効果】

本発明により、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングする方法、および被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを検査する方法が提供された。本発明の方法は、従来の発現クローニング法と異なり、リガンドと核内受容体との特異性を巧みに利用した方法であり、レポーターの活性で目的の遺伝子か否かを検出できるため、例えば、極めて発現量の低いタンパク質をコードする遺伝子でも簡便かつ効率的に検出し、単離することが可能である。

【0046】

また、本発明により上記方法を応用した核内受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法、および被検化合物が核内受容体のリガンドであるか否かを検査する方法が提供された。この方法もリガンドと核内受容体との特異性をりようするため上記の方法と同様に簡便かつ効率的な方法であり、例えば、リガンドの存在が知られていないオーファン受容体のリガンドの検索などに有用である。

【0047】

さらに、本発明により、上記方法を利用して、リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質、具体的には、非活性型ビタミンD₃を活性型ビタミンD₃に変換する活性を有するタンパク質およびその遺伝子が提供された。本発明のタンパク質およびその遺伝子は、1 α 水酸化酵素欠損症患者や腎不全患者の治療および／または予防などへの利用が期待される。また、本発明のタンパク質は、活性型ビタミンD誘導体の製造（1 α 位に水酸基が存在しないビタミンDおよびビタミンD誘導体の、1 α 位の水酸化）へも利用しうる。また、本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質の精製に用いられる他、ビタミンD過剰状態、肉芽腫性疾患、リンパ腫などの治療への利用も期待される。

【配列表】

配列の長さ : 507

トポロジー：直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Met Thr Gln Ala Val Lys Leu Ala

1

5

Ser Arg Val Phe His Arg Ile His Leu Pro Leu Gln Leu Asp Ala Ser

10

15

20

Leu Gly Ser Arg Gly Ser Glu Ser Val Leu Arg Ser Leu Ser Asp Ile

25

30

35

40

Pro Gly Pro Ser Thr Leu Ser Phe Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly

45

50

55

Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu Gln Val His Gly Ala Ala Arg Tyr

60

65

70

Gly Pro Ile Trp Ser Gly Ser Phe Gly Thr Leu Arg Thr Val Tyr Val

75

80

85

Ala Asp Pro Thr Leu Val Glu Gln Leu Leu Arg Gln Glu Ser His Cys

90

95

100

Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Ser Trp Ala Glu His Arg Arg Arg His

105

110

115

120

Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr Ala Asp Gly Glu Glu Trp Gln Arg

125

130

135

Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala

140

145

150

Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Asp Asn Val Val Arg Asp Leu Val Arg Arg

155	160	165
Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly Ser Gly Leu Pro Gly Leu Val Leu		
170	175	180
Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys Phe Gly Leu Glu Ser Ile Gly Ala		
185	190	195
Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly Cys Leu Glu Ala Glu Val Pro Pro		
205	210	215
Asp Thr Glu Thr Phe Ile His Ala Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr		
220	225	230
Leu Leu Thr Met Ala Met Pro Asn Trp Leu His His Leu Ile Pro Gly		
235	240	245
Pro Trp Ala Arg Leu Cys Arg Asp Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala		
250	255	260
Gln Arg His Val Glu Leu Arg Glu Gly Glu Ala Ala Met Arg Asn Gln		
265	270	275
Gly Lys Pro Glu Glu Asp Met Pro Ser Gly His His Leu Thr His Phe		
285	290	295
Leu Phe Arg Glu Lys Val Ser Val Gln Ser Ile Val Gly Asn Val Thr		
300	305	310
Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp		
315	320	325
Thr Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His Pro Asp Val Gln Thr Ala Leu His		
330	335	340
Ser Glu Ile Thr Ala Gly Thr Arg Gly Ser Cys Ala His Pro His Gly		
345	350	355
Thr Ala Leu Ser Gln Leu Pro Leu Leu Lys Ala Val Ile Lys Glu Val		
365	370	375
Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Arg		
380	385	390

Asp Ile Arg Val Gly Asn Tyr Val Ile Pro Gln Asp Thr Leu Val Ser
 395 400 405
 Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser Arg Asp Pro Thr Gln Phe Pro Asp Pro
 410 415 420
 Asn Ser Phe Asn Pro Ala Arg Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His
 425 430 435 440
 Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Ile Gly
 445 450 455
 Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu Leu Gln Met Ala Leu Ser Gln Ile Leu
 460 465 470
 Thr His Phe Glu Val Leu Pro Glu Pro Gly Ala Leu Pro Ile Lys Pro
 475 480 485
 Met Thr Arg Thr Val Leu Val Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe
 490 495 500
 Val Asp Arg
 505

配列番号 : 2

配列の長さ : 508

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配 列

Met Thr Gln Thr Leu Lys Tyr Ala Ser Arg Val Phe His Arg Val Arg
 1 5 10 15
 Trp Ala Pro Glu Leu Gly Ala Ser Leu Gly Tyr Arg Glu Tyr His Ser
 20 25 30
 Ala Arg Arg Ser Leu Ala Asp Ile Pro Gly Pro Ser Thr Pro Ser Phe
 35 40 45

Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu
 50 55 60
 Gln Val Gln Gly Ala Ala His Phe Gly Pro Val Trp Leu Ala Ser Phe
 65 70 75 80
 Gly Thr Val Arg Thr Val Tyr Val Ala Ala Pro Ala Leu Val Glu Glu
 85 90 95
 Leu Leu Arg Gln Glu Gly Pro Arg Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Pro
 100 105 110
 Trp Thr Glu His Arg Arg Cys Arg Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr
 115 120 125
 Ala Glu Gly Glu Glu Trp Gln Arg Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu
 130 135 140
 Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Gly Thr Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Val Val Cys Asp Leu Val Arg Arg Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly
 165 170 175
 Thr Gly Pro Pro Ala Leu Val Arg Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys
 180 185 190
 Phe Gly Leu Glu Gly Ile Ala Ala Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly
 195 200 205
 Cys Leu Glu Ala Gln Val Pro Pro Asp Thr Glu Thr Phe Ile Arg Ala
 210 215 220
 Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr Leu Leu Thr Met Ala Met Pro His
 225 230 235 240
 Trp Leu Arg His Leu Val Pro Gly Pro Trp Gly Arg Leu Cys Arg Asp
 245 250 255
 Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala Gln Arg His Val Glu Arg Arg Glu
 260 265 270
 Ala Glu Ala Ala Met Arg Asn Gly Gly Gln Pro Glu Lys Asp Leu Glu

275	280	285
Ser Gly Ala His Leu Thr His Phe Leu Phe Arg Glu Glu Leu Pro Ala		
290	295	300
Gln Ser Ile Leu Gly Asn Val Thr Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp		
305	310	315
Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp Ala Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His		
	325	330
		335
Pro Glu Val Gln Thr Ala Leu His Ser Glu Ile Thr Ala Ala Leu Ser		
	340	345
		350
Pro Gly Ser Ser Ala Tyr Pro Ser Ala Thr Val Leu Ser Gln Leu Pro		
	355	360
		365
Leu Leu Lys Ala Val Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val		
	370	375
		380
Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Lys Asp Ile His Val Gly Asp Tyr		
385	390	395
		400
Ile Ile Pro Lys Asn Thr Leu Val Thr Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser		
	405	410
		415
Arg Asp Pro Ala Gln Phe Pro Glu Pro Asn Ser Phe Arg Pro Ala Arg		
	420	425
		430
Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe		
	435	440
		445
Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Met Gly Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu		
	450	455
		460
Leu Gln Met Ala Leu Ala Gln Ile Leu Thr His Phe Glu Val Gln Pro		
465	470	475
		480
Glu Pro Gly Ala Ala Pro Val Arg Pro Lys Thr Arg Thr Val Leu Val		
	485	490
		495
Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe Leu Asp Arg		
	500	505

配列番号 : 3

配列の長さ : 2386

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 30 .. 1550

特徴を決定した方法 : E

配 列

CTCTCGAAGC AGACTCCCCA AACACAGAC ATG ACC CAG GCA GTC AAG CTC GCC	53
Met Thr Gln Ala Val Lys Leu Ala	
1 5	
TCC AGA GTT TTT CAC CGA ATC CAC CTG CCT CTG CAG CTG GAT GCC TCG	101
Ser Arg Val Phe His Arg Ile His Leu Pro Leu Gln Leu Asp Ala Ser	
10 15 20	
CTG GGC TCC AGA GGC AGT GAG TCG GTT CTC CGG AGC TTG TCT GAC ATC	149
Leu Gly Ser Arg Gly Ser Glu Ser Val Leu Arg Ser Leu Ser Asp Ile	
25 30 35 40	
CCT GGG CCC TCT ACA CTC AGC TTC CTG GCT GAA CTC TTC TGC AAA GGG	197
Pro Gly Pro Ser Thr Leu Ser Phe Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly	
45 50 55	
GGG CTG TCC AGG CTG CAT GAA CTG CAG GTG CAT GGC GCT GCG CGG TAC	245
Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu Gln Val His Gly Ala Ala Arg Tyr	
60 65 70	
GGG CCA ATA TGG TCT GGC AGC TTT GGG ACA CTT CGC ACA GTT TAC GTT	293
Gly Pro Ile Trp Ser Gly Ser Phe Gly Thr Leu Arg Thr Val Tyr Val	
75 80 85	

GCC GAC CCT ACA CTT GTG GAG CAG CTC CTG CGA CAA GAA AGT CAC TGT	341
Ala Asp Pro Thr Leu Val Glu Gln Leu Leu Arg Gln Glu Ser His Cys	
90 95 100	
CCA GAG CGC TGT AGT TTC TCA TCA TGG GCA GAG CAC CGT CGC CGC CAC	389
Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Ser Trp Ala Glu His Arg Arg Arg His	
105 110 115 120	
CAG CGT GCT TGC GGA TTG CTA ACG GCG GAT GGT GAA GAA TGG CAG AGG	437
Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr Ala Asp Gly Glu Glu Trp Gln Arg	
125 130 135	
CTC CGA AGT CTT CTG GCC CCG CTC CTC CTC CGG CCA CAA GCA GCC GCG	485
Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala	
140 145 150	
GGC TAT GCT GGA ACT CTG GAC AAC GTG GTC CGT GAC CTT GTG CGA CGA	533
Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Asp Asn Val Val Arg Asp Leu Val Arg Arg	
155 160 165	
CTA AGG CGC CAG CGG GGA CGT GGC TCT GGG CTA CCC GGC CTA GTT CTG	581
Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly Ser Gly Leu Pro Gly Leu Val Leu	
170 175 180	
GAC GTG GCA GGA GAG TTT TAC AAA TTT GGC CTA GAA AGT ATA GGC GCG	629
Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys Phe Gly Leu Glu Ser Ile Gly Ala	
185 190 195 200	
GTG CTG CTG GGA TCG CGC CTG GGC TGC CTA GAG GCT GAA GTC CCT CCT	677
Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly Cys Leu Glu Ala Glu Val Pro Pro	
205 210 215	
GAC ACA GAA ACC TTC ATA CAT GCA GTG GGC TCA GTG TTT GTG TCT ACA	725
Asp Thr Glu Thr Phe Ile His Ala Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr	
220 225 230	
CTC TTG ACC ATG GCG ATG CCC AAC TGG TTG CAC CAC CTT ATA CCT GGA	773
Leu Leu Thr Met Ala Met Pro Asn Trp Leu His His Leu Ile Pro Gly	

235	240	245	
CCC TGG GCC CGC CTC TGC CGA GAC TGG GAT CAG ATG TTT GCC TTT GCC			821
Pro Trp Ala Arg Leu Cys Arg Asp Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala			
250	255	260	
CAG AGG CAC GTG GAG CTG CGA GAA GGT GAA GCT GCG ATG AGG AAC CAG			869
Gln Arg His Val Glu Leu Arg Glu Gly Glu Ala Ala Met Arg Asn Gln			
265	270	275	280
GGA AAG CCT GAG GAG GAT ATG CCG TCT GGG CAT CAC TTA ACC CAC TTC			917
Gly Lys Pro Glu Glu Asp Met Pro Ser Gly His His Leu Thr His Phe			
285	290	295	
CTT TTT CGG GAA AAG GTG TCT GTC CAG TCC ATA GTG GGG AAT GTG ACA			965
Leu Phe Arg Glu Lys Val Ser Val Gln Ser Ile Val Gly Asn Val Thr			
300	305	310	
GAG CTA CTA CTG GCT GGA GTG GAC ACG GTA TCC AAT ACG CTC TCC TGG			1013
Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp			
315	320	325	
ACA CTC TAT GAG CTT TCC CGG CAC CCC GAT GTC CAG ACT GCA CTC CAC			1061
Thr Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His Pro Asp Val Gln Thr Ala Leu His			
330	335	340	
TCT GAG ATC ACA GCT GGG ACC CGT GGC TCC TGT GCC CAC CCC CAT GGC			1109
Ser Glu Ile Thr Ala Gly Thr Arg Gly Ser Cys Ala His Pro His Gly			
345	350	355	360
ACT GCT CTG TCC CAG CTG CCC CTG TTA AAG GCT GTG ATC AAA GAA GTG			1157
Thr Ala Leu Ser Gln Leu Pro Leu Leu Lys Ala Val Ile Lys Glu Val			
365	370	375	
TTG AGA TTG TAC CCT GTG GTA CCT GGG AAT TCC CGT GTC CCA GAC AGA			1205
Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Arg			
380	385	390	
GAC ATC CGT GTA GGA AAC TAT GTA ATT CCC CAA GAT ACG CTA GTC TCC			1253

Asp Ile Arg Val Gly Asn Tyr Val Ile Pro Gln Asp Thr Leu Val Ser
 395 400 405
 CTA TGT CAC TAT GCC ACT TCA AGG GAC CCC ACA CAG TTT CCA GAC CCC 1301
 Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser Arg Asp Pro Thr Gln Phe Pro Asp Pro
 410 415 420
 AAC TCT TTT AAT CCA GCT CGC TGG CTG GGG GAG GGT CCG ACC CCC CAC 1349
 Asn Ser Phe Asn Pro Ala Arg Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His
 425 430 435 440
 CCA TTT GCA TCT CTT CCC TTC GGC TTT GGC AAA CGG AGC TGC ATC GGG 1397
 Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Ile Gly
 445 450 455
 AGA CGC TTG GCA GAG CTT GAG CTA CAA ATG GCT TTG TCC CAG ATC TTG 1445
 Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu Leu Gln Met Ala Leu Ser Gln Ile Leu
 460 465 470
 ACC CAT TTT GAA GTG CTA CCT GAG CCA GGT GCT CTT CCT ATC AAG CCC 1493
 Thr His Phe Glu Val Leu Pro Glu Pro Gly Ala Leu Pro Ile Lys Pro
 475 480 485
 ATG ACC CGG ACT GTC CTG GTC CCT GAG AGG AGC ATC AAT CTA CAG TTT 1541
 Met Thr Arg Thr Val Leu Val Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe
 490 495 500
 GTA GAT AGA TAACCATTCTG GAAGACAGCC AACATCGTCT CTCTCAAGAC 1590
 Val Asp Arg
 505
 AGGATGGGGT CTTTGTATA CACAAGAGGC AACTCTCCT TGGAGGCCTG TCTGACCGAG 1650
 CAAACTCCAG GAAGCAGGTC CTGACCTATG TGTACTTGGC CTGACTCAGC AGGCATCGCA 1710
 GAACCACCAT CTTTCTCCTT CCTGCTCAGT GCCTCTCCTG ATCATTCTC AGGATCCAAT 1770
 GCCTTCAGAT TTAAACACAT CCTTAAAGTG CCAACGCAGG GGTAACTAC CAACTCCAGG 1830
 CAGCCTGGGG AGGGATTCTG CCCTGATCCT GTAGTGTTCTG TTGATGCTCT GTCTAAGCAT 1890
 TTATCACGGC ACAAGCTAAG TGATTGCATC TGGTCTGCAC CTGGCTGCAT CTCTACCTGA 1950

CCATGTGTGT GCCTTCTGAG AAGAGTAATG ACTAGTCTAC TGGGCTTTTA GCTCTTTTTC 2010
 TTTTGTAGAC AGAGTCTTGC TATGTATTCC ATGCTGTCCT GGAAATTCAC AACTTCCTTG 2070
 CCTCACCTTT CCCAAGTATT GGGTTACAGA CTTGAGCTAC CACTTCCAGC TGTATCAGTC 2130
 TTTATATCTC CTGCCAGAGT CTATCCCTTG GTTATTTTCAG CACCATACAT TTCTCAGACT 2190
 GAACCTGGAC CATGTGGCAG GATCGTCCAC TCACCAGGCT CTGCCCACCC TTTTCTCTC 2250
 TTAATCTTTC CTCTAGGGAA GTAAATCTGC CCTTGCCTAA TTTACAGCGT TTTTAAGCCT 2310
 CCGCTACCTT GGTCTTCAG CCACTCTCAA GTGGATCCAC TTTCTTATCA TCCATGTTTA 2370
 GGCTGCCCCT TCTCCA 2386

配列番号 : 4

配列の長さ : 2362

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 .. 1524

特徴を決定した方法 : E

配 列

ATG ACC CAG ACC CTC AAG TAC GCC TCC AGA GTG TTC CAT CGC GTC CGC 48
 Met Thr Gln Thr Leu Lys Tyr Ala Ser Arg Val Phe His Arg Val Arg
 1 5 10 15
 TGG GCG CCC GAG TTG GGC GCC TCC CTA GGC TAC CGA GAG TAC CAC TCA 96
 Trp Ala Pro Glu Leu Gly Ala Ser Leu Gly Tyr Arg Glu Tyr His Ser
 20 25 30
 GCA CGC CGG AGC TTG GCA GAC ATC CCA GGC CCC TCT ACG CCC AGC TTT 144
 Ala Arg Arg Ser Leu Ala Asp Ile Pro Gly Pro Ser Thr Pro Ser Phe
 35 40 45
 CTG GCC GAA CTT TTC TGC AAG GGG GGG CTG TCG AGG CTA CAC GAG CTG 192

Leu	Ala	Glu	Leu	Phe	Cys	Lys	Gly	Gly	Leu	Ser	Arg	Leu	His	Glu	Leu	
50						55					60					
CAG	GTG	CAG	GGC	GCC	GCG	CAC	TTC	GGG	CCG	GTG	TGG	CTA	GCC	AGC	TTT	240
Gln	Val	Gln	Gly	Ala	Ala	His	Phe	Gly	Pro	Val	Trp	Leu	Ala	Ser	Phe	
65					70					75					80	
GGG	ACA	GTG	CGC	ACC	GTG	TAC	GTG	GCT	GCC	CCT	GCA	CTC	GTC	GAG	GAG	288
Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Val	Tyr	Val	Ala	Ala	Pro	Ala	Leu	Val	Glu	Glu	
				85						90					95	
CTG	CTG	CGA	CAG	GAG	GGA	CCC	CGG	CCC	GAG	CGC	TGC	AGC	TTC	TCG	CCC	336
Leu	Leu	Arg	Gln	Glu	Gly	Pro	Arg	Pro	Glu	Arg	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	
				100					105						110	
TGG	ACG	GAG	CAC	CGC	CGC	TGC	CGC	CAG	CGG	GCT	TGC	GGA	CTG	CTC	ACT	384
Trp	Thr	Glu	His	Arg	Arg	Cys	Arg	Gln	Arg	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Thr	
				115					120						125	
GCG	GAA	GGC	GAA	GAA	TGG	CAA	AGG	CTC	CGC	AGT	CTC	CTG	GCC	CCG	CTC	432
Ala	Glu	Gly	Glu	Glu	Trp	Gln	Arg	Leu	Arg	Ser	Leu	Leu	Ala	Pro	Leu	
				130					135						140	
CTC	CTC	CGG	CCT	CAA	GCG	GCC	GCC	CGC	TAC	GCC	GGA	ACC	CTG	AAC	AAC	480
Leu	Leu	Arg	Pro	Gln	Ala	Ala	Ala	Arg	Tyr	Ala	Gly	Thr	Leu	Asn	Asn	
				145					150						160	
GTA	GTC	TGC	GAC	CTT	GTG	CGG	CGT	CTG	AGG	CGC	CAG	CGG	GGA	CGT	GGC	528
Val	Val	Cys	Asp	Leu	Val	Arg	Arg	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Gly	Arg	Gly	
				165					170						175	
ACG	GGG	CCG	CCC	GCC	CTG	GTT	CGG	GAC	GTG	GCG	GGG	GAA	TTT	TAC	AAG	576
Thr	Gly	Pro	Pro	Ala	Leu	Val	Arg	Asp	Val	Ala	Gly	Glu	Phe	Tyr	Lys	
				180					185						190	
TTC	GGA	CTG	GAA	GGC	ATC	GCC	GCG	GTT	CTG	CTC	GGC	TCG	CGC	TTG	GGC	624
Phe	Gly	Leu	Glu	Gly	Ile	Ala	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Ser	Arg	Leu	Gly	
				195					200						205	

TGC CTG GAG GCT CAA GTG CCA CCC GAC ACG GAG ACC TTC ATC CGC GCT	672
Cys Leu Glu Ala Gln Val Pro Pro Asp Thr Glu Thr Phe Ile Arg Ala	
210 215 220	
GTG GGC TCG GTG TTT GTG TCC ACG CTG TTG ACC ATG GCG ATG CCC CAC	720
Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr Leu Leu Thr Met Ala Met Pro His	
225 230 235 240	
TGG CTG CGC CAC CTT GTG CCT GGG CCC TGG GGC CGC CTC TGC CGA GAC	768
Trp Leu Arg His Leu Val Pro Gly Pro Trp Gly Arg Leu Cys Arg Asp	
245 250 255	
TGG GAC CAG ATG TTT GCA TTT GCT CAG AGG CAC GTG GAG CGG CGA GAG	816
Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala Gln Arg His Val Glu Arg Arg Glu	
260 265 270	
GCA GAG GCA GCC ATG AGG AAC GGA GGA CAG CCC GAG AAG GAC CTG GAG	864
Ala Glu Ala Ala Met Arg Asn Gly Gly Gln Pro Glu Lys Asp Leu Glu	
275 280 285	
TCT GGG GCG CAC CTG ACC CAC TTC CTG TTC CGG GAA GAG TTG CCT GCC	912
Ser Gly Ala His Leu Thr His Phe Leu Phe Arg Glu Glu Leu Pro Ala	
290 295 300	
CAG TCC ATC CTG GGA AAT GTG ACA GAG TTG CTA TTG GCG GGA GTG GAC	960
Gln Ser Ile Leu Gly Asn Val Thr Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp	
305 310 315 320	
ACG GTG TCC AAC ACG CTC TCT TGG GCT CTG TAT GAG CTC TCC CGG CAC	1008
Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp Ala Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His	
325 330 335	
CCC GAA GTC CAG ACA GCA CTC CAC TCA GAG ATC ACA GCT GCC CTG AGC	1056
Pro Glu Val Gln Thr Ala Leu His Ser Glu Ile Thr Ala Ala Leu Ser	
340 345 350	
CCT GGC TCC AGT GCC TAC CCC TCA GCC ACT GTT CTG TCC CAG CTG CCC	1104
Pro Gly Ser Ser Ala Tyr Pro Ser Ala Thr Val Leu Ser Gln Leu Pro	

355	360	365	
CTG CTG AAG GCG GTG GTC AAG GAA GTG CTA AGA CTG TAC CCT GTG GTA			1152
Leu Leu Lys Ala Val Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val			
370	375	380	
CCT GGA AAT TCT CGT GTC CCA GAC AAA GAC ATT CAT GTG GGT GAC TAT			1200
Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Lys Asp Ile His Val Gly Asp Tyr			
385	390	395	400
ATT ATC CCC AAA AAT ACG CTG GTC ACT CTG TGT CAC TAT GCC ACT TCA			1248
Ile Ile Pro Lys Asn Thr Leu Val Thr Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser			
405	410	415	
AGG GAC CCT GCC CAG TTC CCA GAG CCA AAT TCT TTT CGT CCA GCT CGC			1296
Arg Asp Pro Ala Gln Phe Pro Glu Pro Asn Ser Phe Arg Pro Ala Arg			
420	425	430	
TGG CTG GGG GAG GGT CCC ACC CCC CAC CCA TTT GCA TCT CTT CCC TTT			1344
Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe			
435	440	445	
GGC TTT GGC AAG CGC AGC TGT ATG GGG AGA CGC CTG GCA GAG CTT GAA			1392
Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Met Gly Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu			
450	455	460	
TTG CAA ATG GCT TTG GCC CAG ATC CTA ACA CAT TTT GAG GTG CAG CCT			1440
Leu Gln Met Ala Leu Ala Gln Ile Leu Thr His Phe Glu Val Gln Pro			
465	470	475	480
GAG CCA GGT GCG GCC CCA GTT AGA CCC AAG ACC CGG ACT GTC CTG GTA			1488
Glu Pro Gly Ala Ala Pro Val Arg Pro Lys Thr Arg Thr Val Leu Val			
485	490	495	
CCT GAA AGG AGC ATC AAC CTA CAG TTT TTG GAC AGA TAGTCCCATG			1534
Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe Leu Asp Arg			
500	505		
GAAAGAGACT GTCATCATCA CCCTTTCATT CATCATAGGG ATAAGATTTT TTGTAGGCAC			1594

```

AAGACCAAGG TATACATCTT CCCCTAATGC CTATCTGACC AAACCTGGATA GAACCACCAT 1654
AGTGAAGTGT GAGGCGGCTC TGACCAATGT GTGAAGTATG CACTTGGCCT GACTCAGGAA 1714
GCCAGGTGAG AAAACCATGG TCTCTCTGCT TGCTTGGCCC TTCTGATCAT GTATGCATCC 1774
CCCAAGGATG AAATCAGATT TTAACATAATA ATGCTGGATG GCCTGAAGGA AAGATTCAAC 1834
TGCCTCTCTT TTTGGGCTTT CATAGTGTTT ATTGATGCTG CTGGCTRRGC ATTTGTCAAA 1894
GCATAAGCTC AGTAGCTGTG CATCTGGTCT GNACCTGGTT GGTCCTTCGT CTTTGCATGT 1954
AAGCTCTTTG AGAGGAAGGG TGAAGTCTTA TTTGTTTTTT ATGTCCCCTG CCAGGGCCTG 2014
TCTCTGACTA GGTGTCACCA TACACATTCT TAGATTGAAT CTGAACCATG TGGCAGAAGG 2074
GATAAGCAGC TTACTTAGTA GGCTCTGTCT ACCCCCTTCC TTCTTTGTCT TGCCCCTAGG 2134
AAGGTGAATC TGCCCTAGCC TGGTTTACGG TTTCTTATAA CTCTCCTTTG CTCTCTGGCC 2194
ACTATTAGGT GGGTTTGCCC CATCACTTAG TTCTCAGGCA GAGACATCTT TGGGCCTGTC 2254
CCTGCCCAGG CCTCTGGCTT TTTATATTGA AAATTTTAA ATATTCACAA ATTTTAGAAT 2314
AAACCAAATA TTCCATTCTT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2362

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

VDRを介した発現クローニング系の概略を示す図である。

【図2】

3週目及び7週目のVDR+/+マウス、VDR+/-マウス、VDR-/-マウスの $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の血清濃度を示すグラフである。

【図3】

細胞のX-gal染色を示す顕微鏡写真である。(b)は発現cDNAライブラリーを形質転換したCOS-1細胞、(a)はネガティブコントロール、(c)はポジティブコントロールを示し、(d)は(b)における陽性細胞から抽出したcDNAをPCRにより増幅させ、再度染色した結果を示す。

【図4】

CYP1ADの推定アミノ酸配列を示す図である。最初のメチオニンを1位として番号を付した。末端コドンはアステリクスによって示した。推定されるミトコンドリア標的シグナルを四角で囲った。ステロール結合ドメインに下線を引いた。ヘム結合ドメインは点線の下線で示した。

【図5】

「CYP1A₂」と、ラット25(OH)アーゼ(CYP27)及びマウス24(OH)アーゼ(CYP24)との相同性を示す図である。ステロール結合ドメイン及びヘム結合ドメインのアミノ酸配列の相同性も示されている。

【図6】

インビトロで翻訳された「CYP1A₂」蛋白質を、10%SDS-PAGEにより解析した電気泳動写真である。

【図7】

「CYP1A₂」のインビボにおける活性を検出するためのCATアッセイの結果を示す図である。1つの代表的なCATアッセイを下図に示し、CAT比活性を、3つの独立した実験についての平均値およびSEMとして上図に示す。

【図8】

25(OH)D₃代謝物の順相HPLC解析を示す図である。

【図9】

25(OH)D₃代謝物の逆相HPLC解析を示す図である。

【図10】

「CYP1A₂」転写産物の組織分布を解析するためのノーザンブロットを示す図である。

【図11】

過剰量の1 α ,25(OH)₂D₃を投与した(50ng/匹)(+)、または投与していない(-)、3週目及び7週目のVDR+/+マウス、VDR+/-マウス、VDR-/-マウスで行ったノーザンブロットを示す図である。

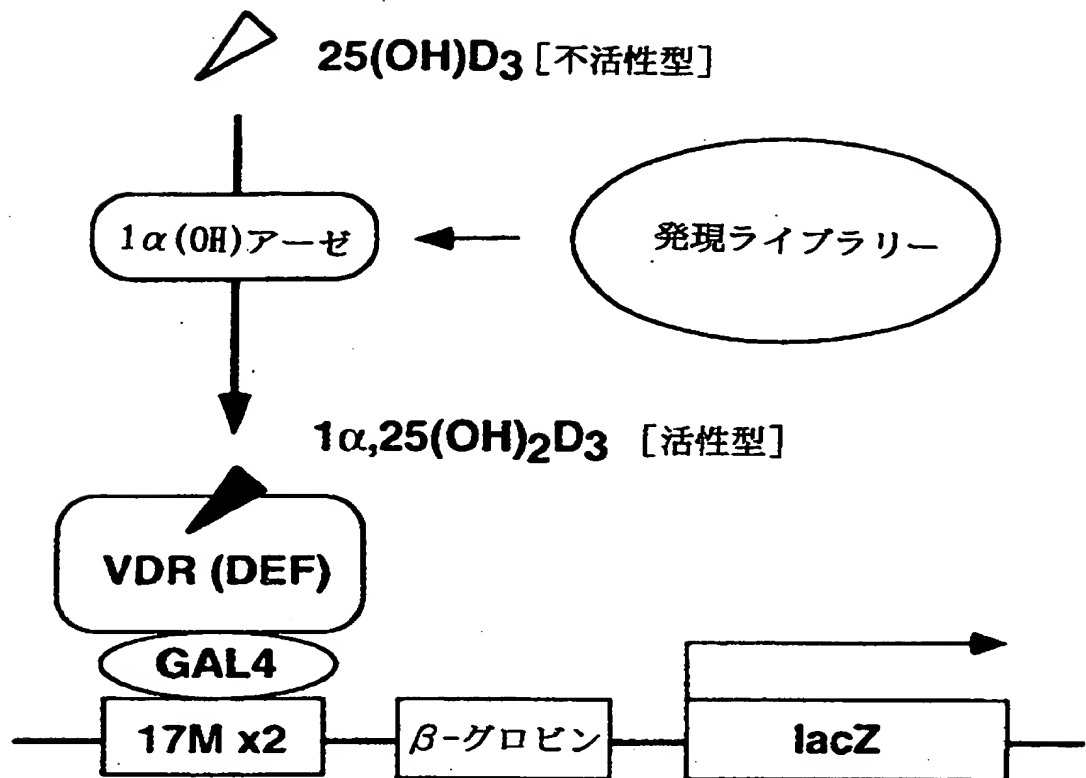
【図12】

過剰量の1 α ,25(OH)₂D₃を投与した(50ng/匹)(+)、または投与していない(-)、3週目及び7週目のVDR+/+マウス、vdr+/-マウス、VDR-/-マウスにおける、水酸化酵素遺伝子の相対量を示すグラフである。

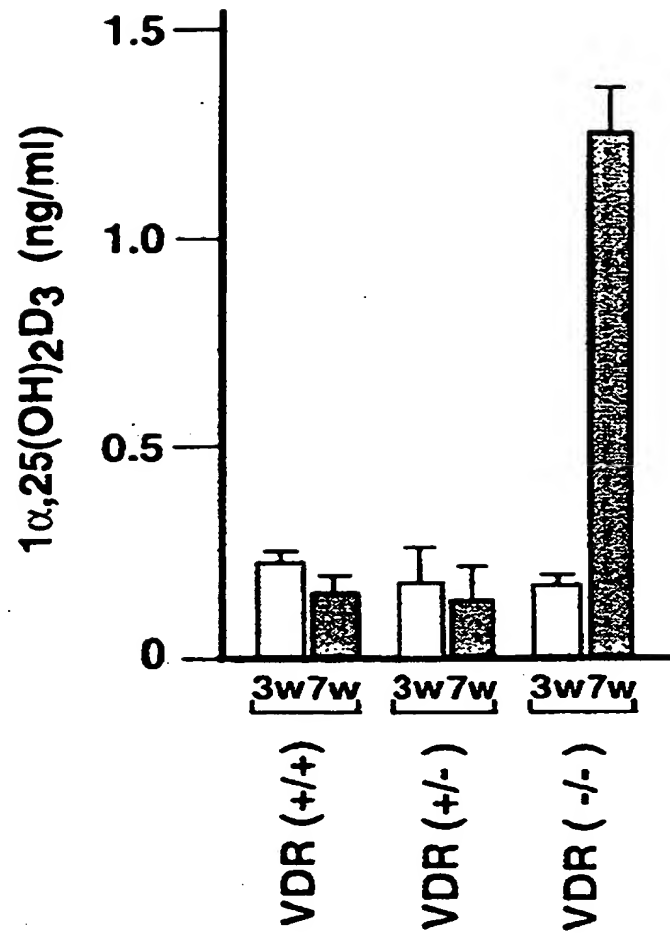
【書類名】

図面

【図1】

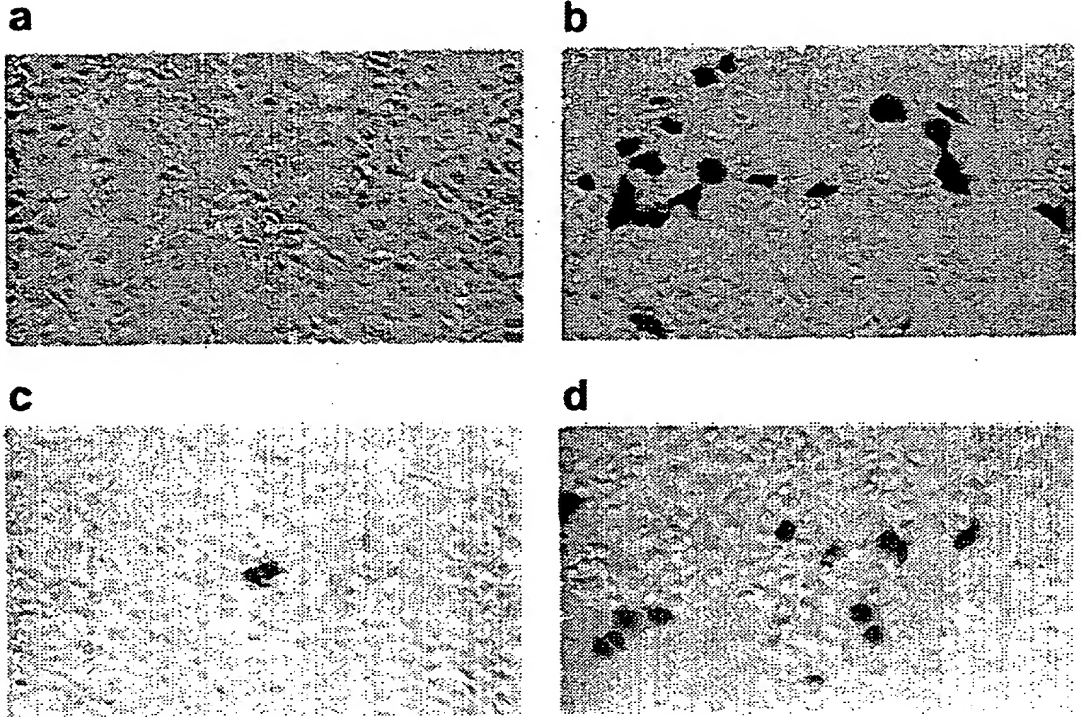


【図2】



【図3】

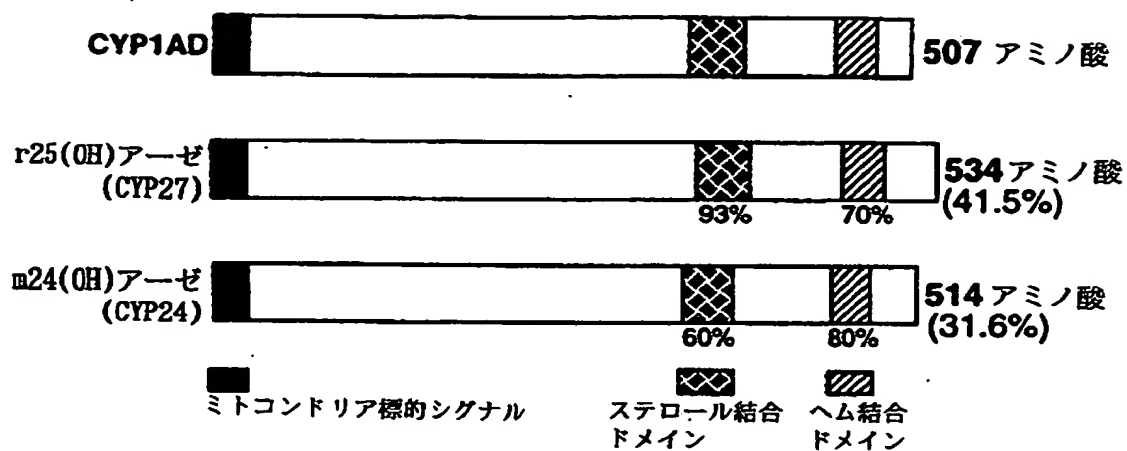
図面代用写真



【図4】

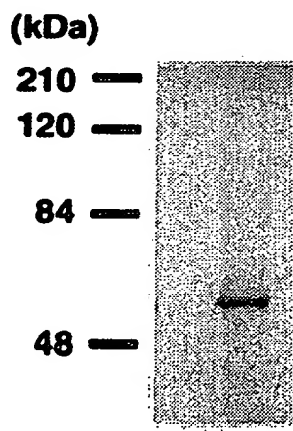
1	MTQAVKLASRVF	<u>HRIHLPL</u>	QLDASLGSRGSESVLRSLSDI	40
41	PGPSTLSFLAELFCKGGLSRLHELQVHGAARYGPIWSGSF			80
81	GTLRTVYVADPTLVEQLLRQESHCPERCSFSSWAEHRRRH			120
121	QRACGLLTADGEEWQRLRSLLAPLLLRPQAAAGYAGTLDN			160
161	VVRDLVRRRLRRQRGRGSGLPGLVLDVAGEFYKFGLESIGA			200
201	VLLGSRLGCLAEVPPDTETFIHAVGSVFVSTLLTMAMPN			240
241	WLHHLIPGPWARLCRDWDQMFAFAQRHVELREGEAAMRNQ			280
281	GKPEEDMPSGHHLTHFLFREKVSQSVGNVTELLLAGVD			320
321	TVSNTLSWTLYELSRHPDVQTALHSEITAGTRGSCAHPHG			360
361	TALSQL	<u>PLLKAVIKEVLRLYP</u>	VVPGNSRV	400
401	IPQDTLVSLCHYATSRDPTQFPDPNSFNPARWLGEPTPH			440
441	PFASLP	<u>FGFGKRSCIG</u>	RRLAELELQMALSQILTHFEVLPE	480
481	PGALPIKPMTR	TVLVPERSINLQFVDR*		

【図5】



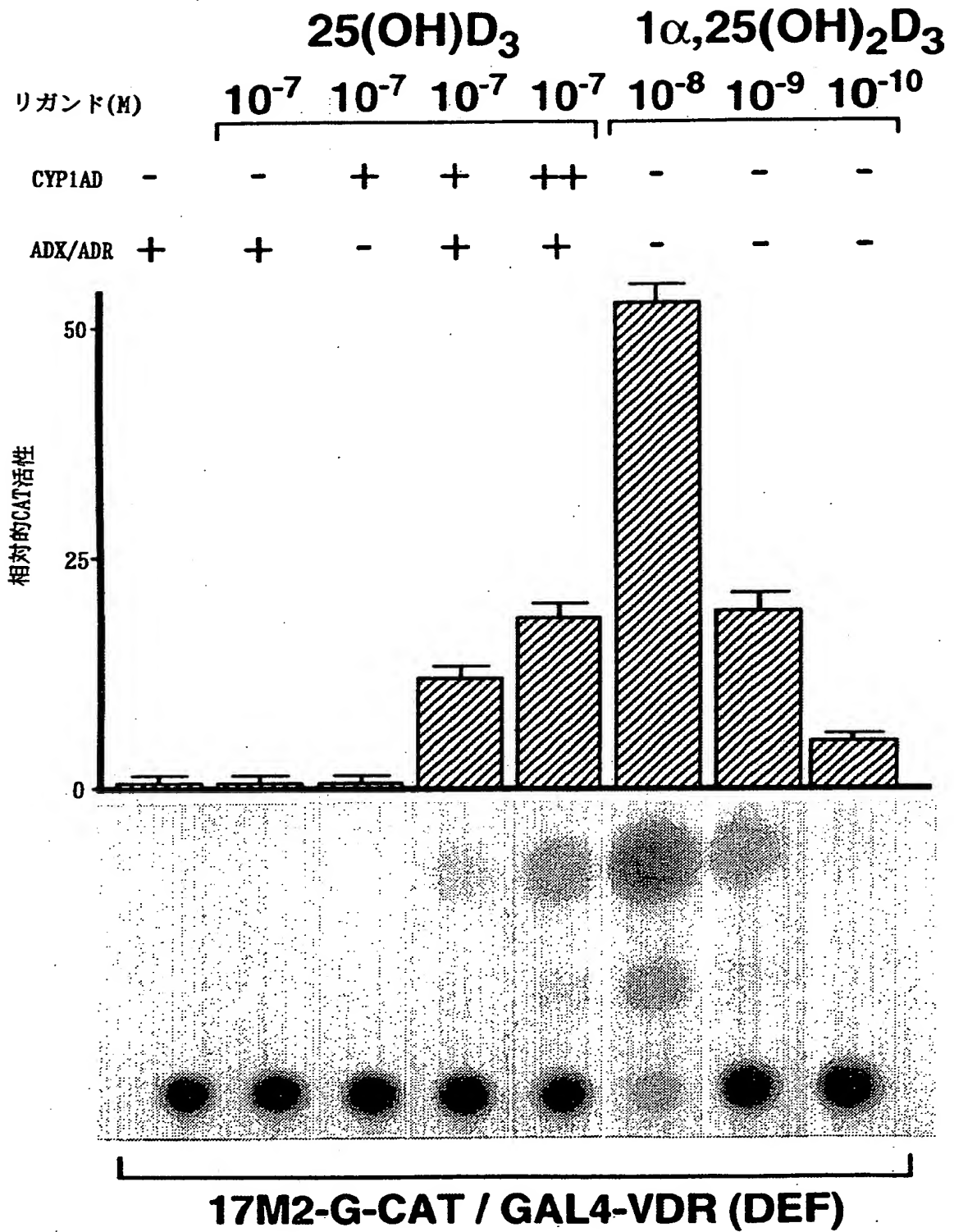
【図6】

図面代用写真

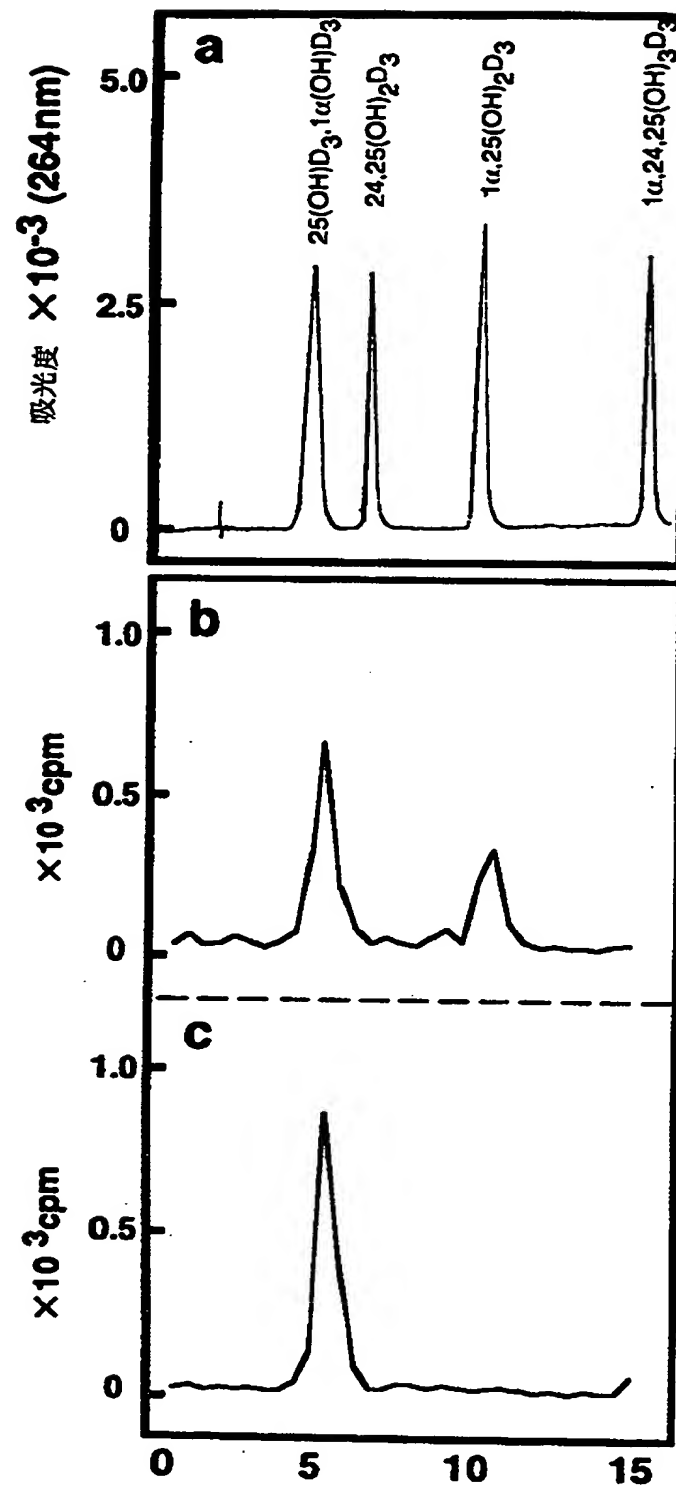


【図7】

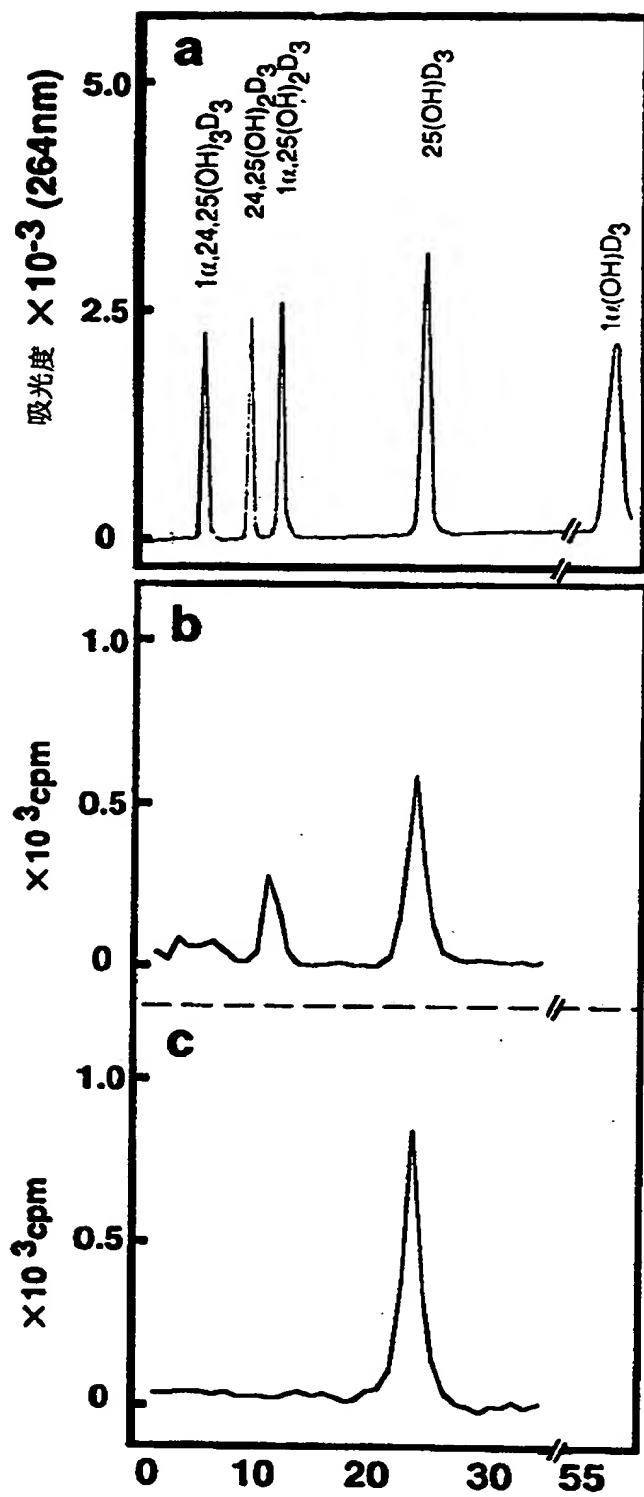
図面代用写真



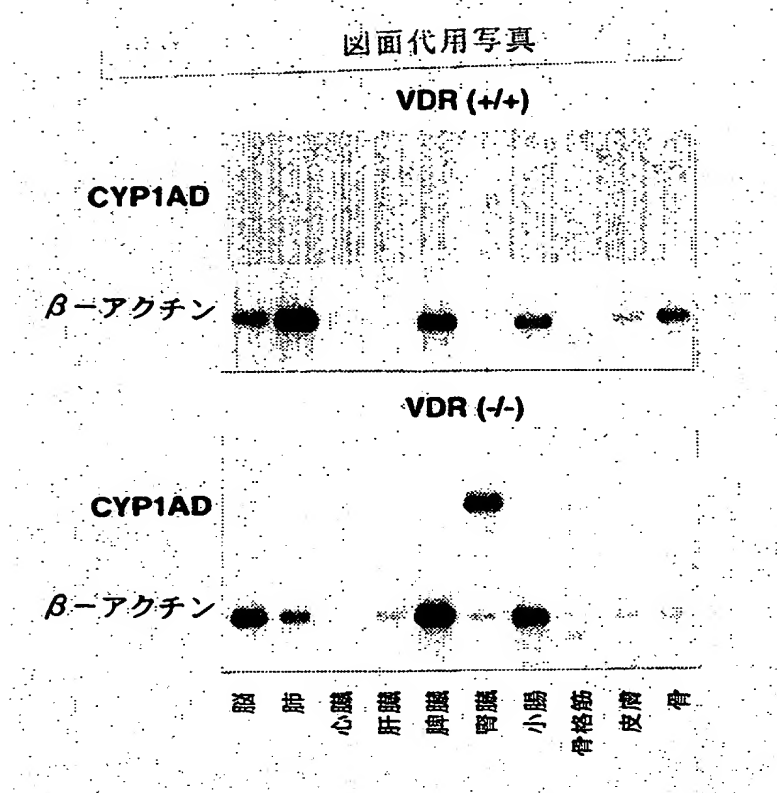
【图 8】



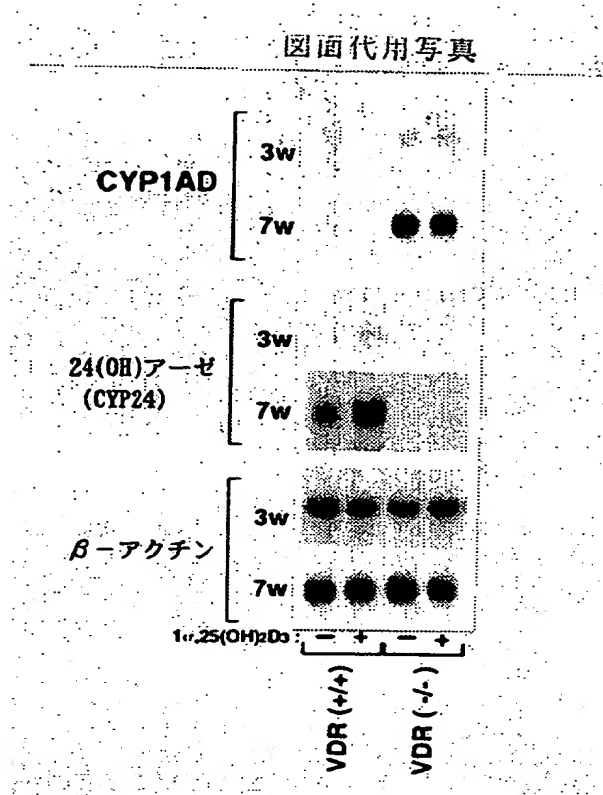
【図9】



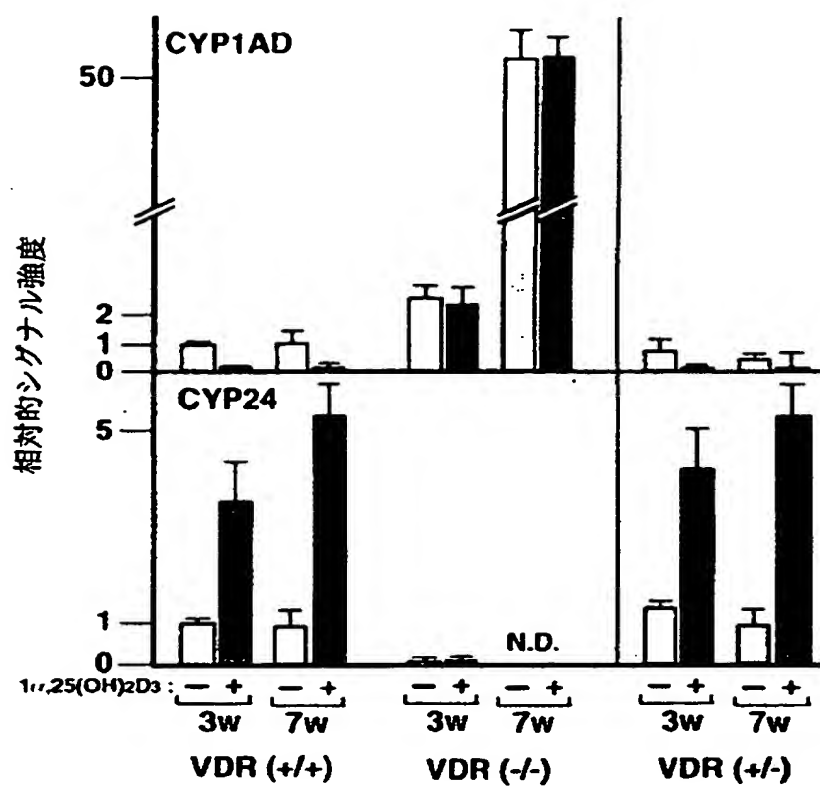
【図10】



【図11】



【図12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子を簡便かつ効率的にスクリーニングする方法、および被検遺伝子がリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを簡便に検査する方法を提供することを課題とする。また、該スクリーニング法を用いてリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質およびその遺伝子を単離することを課題とする。

【解決手段】 リガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質の発現によってリガンドが生成された場合に、該リガンドが核内受容体と結合し、その標的配列の下流のレポーター遺伝子を発現させるシステムの構築に成功した。さらに、このシステムを利用して遺伝子ライブラリーの検索を行い、実際にリガンドの前駆体をリガンドへ変換するタンパク質をコードする遺伝子を単離することに成功した。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階

清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成 9年11月11日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 平成 9年特許願第212624号
【補正をする者】
【事件との関係】 特許出願人
【識別番号】 000003311
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社
【代理人】
【識別番号】 100102978
【弁理士】
【氏名又は名称】 清水 初志
【発送番号】 030305
【手続補正 1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 提出物件の目録
【補正方法】 追加
【補正の内容】
【提出物件の目録】
【物件名】 委任状 1

29721700108



委任状

平成 9 年 11 月 5 日

私は、識別番号 100102978 弁理士 清水 初志
識別番号 100108774 弁理士 橋本 一憲
を以て代理人として下記事項を委任します。



1. 特許出願、特許権の存続期間の延長登録の出願、実用新案登録出願、意匠登録出願、商標（防護標章）登録出願及び商標権（防護標章登録に基づく権利）存続期間更新登録出願に関する手続
1. 上記出願に基づく特許法第41条第1項または実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録に対する登録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 国内優先権主張の先の出願である
に基づく特許法第41条第1項または実用新案法第8条第1項の優先権の主張及びその取下げ
1. 上記事項を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所又は居所
氏名又は名称
代表者

東京都北区浮間5丁目5番1号
中外製薬株式会社
取締役社長 永山 治



【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】
【識別番号】 000003311
【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 清水 初志
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名 中外製薬株式会社